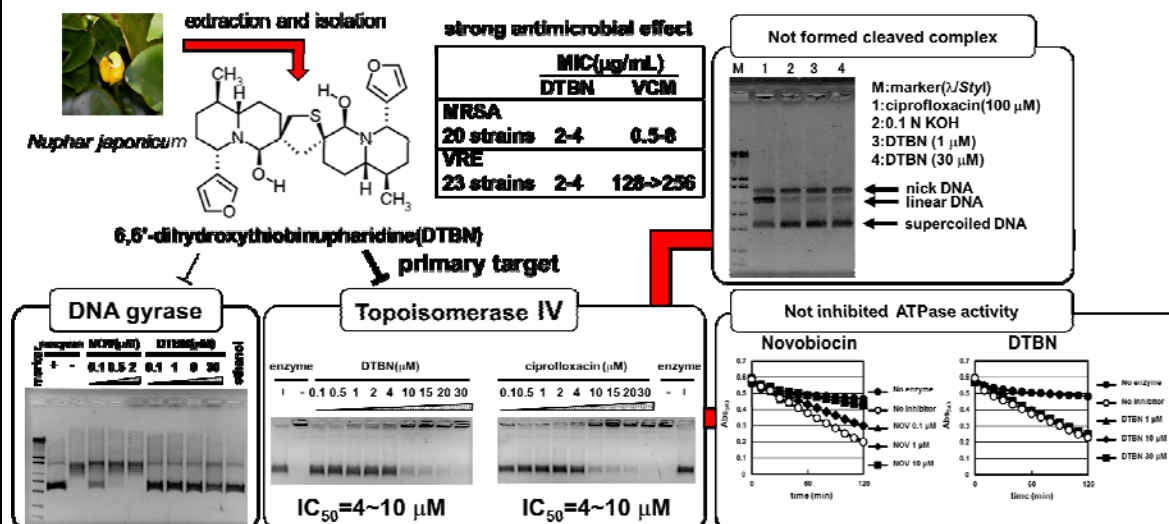


氏 名	岡村 真弥
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	薬 科 学
学位記授与番号	博甲第 5516 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科 薬科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	コウホネ由来化合物 6,6'-dihydroxythiobinupharidine (DTBN) の抗菌作用と作用機構の解析

### 学位論文の要約

#### 【グラフィックアブストラクト】



#### 【背景・目的】

近年、臨床現場では薬剤耐性菌が出現し深刻な問題となっている。薬剤耐性菌による感染症は治療に有効な抗菌薬が限定されるため、治療が困難となり患者が死に至る場合もある。代表的な薬剤耐性菌としてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）やバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）が知られている。MRSA は現在、最も臨床分離される頻度の高い薬剤耐性菌である。VRE は治療に有効な抗菌薬が MRSA 以上に限定されるため、今後の動向には注意が必要である。MRSA や VRE 感染症に対する治療薬としては、バンコマイシンやテイコプラニン、アルベカシン、リネゾリド、ダプトマイシンといった抗菌薬が用いられる。しかし、これらの抗菌薬に対してそれぞれ耐性を獲得した株が報告されている。そのため、新たな抗菌薬の開発は急務であるといえる。薬剤耐性菌に対する新規抗菌薬のシーズとして、薬剤耐性菌に対して抗菌活性を有する化合物や既存抗菌薬と強い併用効果を示す化合物が考えられる。そこで、私は新規抗菌薬のシード化合物を探索することを目的に、こういった活性を有する化合物を生薬から探索し作用機構を解析する研究に取り組んだ。

#### 【実験方法】

スイレン科コウホネの根茎を乾燥させた生薬であるセンコツに含まれる成分を 100%メタノールにより抽出した。100 %メタノール抽出物を酸性、塩基性条件下で液々分配することにより酸性化合物画分、塩基性化合物画分を得た。強い抗菌活性の見られた塩基性化合物画分について、二回のシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画した。強い抗菌活性を示し、薄層クロマトグラフィーで単一のスポットを呈した画分について、核磁気共鳴分析、質量分

析、旋光度分析により構造を決定した。得られた画分や化合物について、微量液体希釈法により最小生育阻止濃度（MIC）を測定することで抗菌活性を評価した。大腸菌由来無細胞タンパク質合成キット（太陽日酸）に template DNA として pRSET/CFP を用いることでタンパク質合成量を蛍光強度で定量し、化合物のタンパク質合成阻害活性を評価した。黄色ブドウ球菌 N315 株を用いて、化合物曝露時の ethidium bromide の細胞内への流入を蛍光観察することで膜傷害性を評価した。化合物曝露時の形態的な変化を走査型電子顕微鏡により観察した。黄色ブドウ球菌由来 DNA gyrase (Inspiralis) を用いて、Relaxed DNA を Supercoiled DNA に変換する活性に対する阻害活性を評価した。黄色ブドウ球菌由来 Topoisomerase IV (Inspiralis) を用いて連環状の kinetoplast DNA を脱連環する decatenation 活性に対する阻害活性を評価した。Topoisomerase IV を用いて Cleaved complex の形成に伴って生じた linear DNA の量を測定し、Cleaved complex 形成の有無を評価した。Topoisomerase IV による ATP 消費量をピルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酵素と共役させた NADH 消費量で定量し、ATPase 阻害活性を評価した。6,6'-dihydroxythiobinupharidine (DTBN) を MIC 以下の 1  $\mu\text{g/mL}$  添加した培地と DTBN を含まない培地を用いて既存抗菌薬の MIC を測定し、両者を比較することによって併用効果を評価した。バンコマイシン耐性遺伝子の発現を RT-PCR 法にて解析した。

## 【結果】

### 『抗菌活性をもつ DTBN の単離と同定』

生薬センコツから MRSA や VRE に対して強い抗菌活性を有する化合物として 6,6'-dihydroxythiobinupharidine (DTBN) を単離・同定した (Fig. 1)。臨床分離株を含む 20 株の MRSA、23 株の VRE に対する DTBN の MIC は 1~4  $\mu\text{g/mL}$  であった。既存の抗 MRSA 薬であるアルベカシンやバンコマイシン、リネゾリドの MRSA に対する MIC は 1  $\mu\text{g/mL}$  程度であったこと、VRE 感染症に用いられる可能性のあるリネゾリドの VRE に対する MIC も 1  $\mu\text{g/mL}$  程度であったことから、DTBN は MRSA や VRE に対して既存の抗菌薬と同程度の強い抗菌活性を有することが明らかとなった。MRSA、VRE に対して DTBN が殺菌的か静菌的かを評価するため、DTBN 曝露後の生菌数の変化を経時的に観察した。その結果、MRSA、VRE 共に 4 倍の MIC の濃度で DTBN を曝露した際にも顕著な生菌数の低下は観察されなかった。したがって、DTBN はこれらの菌に対して静菌的な抗菌活性を有することがわかった。

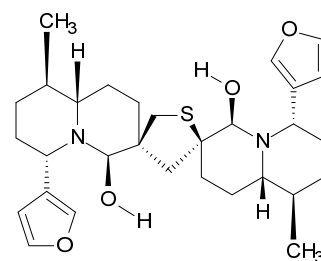


Fig. 1 DTBN 構造式

### 『DTBN の抗菌作用機構の解析』

まず、既存抗菌薬の作用機構であるタンパク質合成阻害活性、膜傷害活性、DNA 複製阻害活性について検討を行った。種々の解析の結果、DTBN はタンパク質合成阻害活性や膜傷害活性、DNA gyrase に対して顕著な阻害活性を示さず、走査型電子顕微鏡で確認可能な形態的な変化をもたらさなかった。

一方で、DTBN は Topoisomerase IV に対して顕著な阻害活性を示した (Fig. 2)。DTBN の Topoisomerase IV に対する阻害活性を、既存の Topoisomerase IV 阻害剤であるキノロン系抗菌薬のシプロフロキサシンと比較した。シプロフロキサシンの Topoisomerase IV に対する  $\text{IC}_{50}$  は 8.1  $\mu\text{M}$  である一方、DTBN の  $\text{IC}_{50}$  は 17.2  $\mu\text{M}$  であった。既存抗菌薬と同程度の阻害活性を示したことから DTBN は Topoisomerase IV を阻害することで抗菌活性を示していることが示唆された。

更に、DTBN の Topoisomerase IV に対する作用機序について解析を進めた。まず、DTBN が Topoisomerase IV に対して、キノロン系抗菌薬のような Cleaved complex を形成するかどう

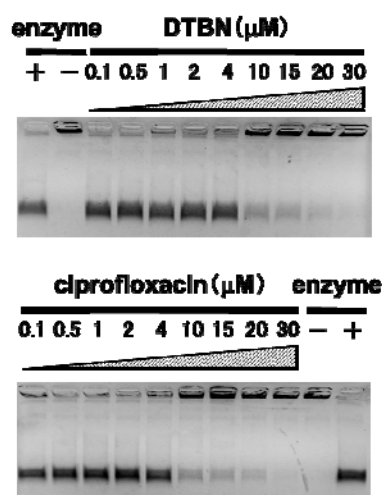


Fig. 2  
Topoisomerase IV  
decatenation assay

うかについて解析した。また、DTBN の Topoisomerase IV の ATPase 活性に対する阻害活性について解析した。その結果、DTBN は Cleaved complex を形成せず、ATPase 活性も阻害しな

いことが明らかとなった。このことから、DTBN の Topoisomerase IV に対する作用機序は既存のキノロン系抗菌薬と異なることが強く示唆された。

次にゲノム情報が判明している MRSA である N315 株を用いて、DTBN を曝露することにより耐性変異株を得ることを試みた。まず、MIC の 4 倍の濃度の DTBN を含む寒天培地上に塗布した。しかし、 $10^{10}$  Colony forming Unit 程度の菌数を用いても耐性変異株は得られなかった。そこで、液体培地を用いた継代培養により、DTBN を低濃度から順に高濃度へと曝露した。各段階の培養液から単一のコロニーを 3 株選択し、解析を行った。結果、DTBN を MIC 以上の濃度で曝露した培養液から得られた株はキノロン耐性決定領域 (QRDR) に変異が生じることで、キノロン系抗菌薬に耐性化していることが明らかとなった (Table 1)。一方で、変異株に対するキノロン系抗菌薬の MIC は 32 倍に上昇しているのに対し、DTBN の MIC は 2 倍に上昇しているのみであった。

Table 1 耐性変異株の分離と解析

		Staphylococcus aureus strains				
		N315 (parent)	DTR1B1 [1/4 × MIC mutant]	DTR2B1 [1/2 × MIC mutant]	DTR4BL1 [1 × MIC mutant]	DTR8BL1 [2 × MIC mutant]
Mutation in QRDR	GyrA	-	-	-	S84L	S84L
	ParC	-	-	-	S80F	S80F
MIC (μg/mL)	NFLX	2	2	2	64	64
	CFLX	0.5	0.5	1	32	32
	DTBN	2	4	4	4	4

### 『既存抗菌薬との併用効果』

DTBN と既存抗菌薬の併用効果について解析した (Table 2)。VRE に対して DTBN を MIC 以下の濃度で併用することによりバンコマイシンの MIC がバンコマイシン感受性腸球菌 (VSE) に対する MIC と同程度まで低下することが明らかとなった。更に、VRE、VSE、MRSA、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) といった今回用いた腸球菌、黄色ブドウ球菌のほぼ全ての株に対して DTBN はアミノグリコシド系抗菌薬の抗菌活性を大幅に増強させることが明らかとなった。

DTBN とバンコマイシンの併用効果について、解析を進めた。VRE に対してバンコマイシン、DTBN を単独、併用曝露した際のバンコマイシン耐性遺伝子の発現を RT-PCR 法にて解析した (Fig. 3)。その結果、DTBN とバンコマイシンを併用曝露した際に耐性遺伝子の顕著な発現の低下は見られなかった。このことから、DTBN とバンコマイシンの併用効果は耐性遺伝子の発現抑制によるものではないことが明らかとなった。

Table 2 DTBN と既存抗菌薬の併用効果

		MIC(μg/mL)	
		バンコマイシン	アルベカシン
VRE	control	256	256
FN-1	DTBN併用	1	1
VSE	control	2	4
ATCC19434	DTBN併用	2	0.25
MRSA	control	0.5	1
N315	DTBN併用	0.5	0.13
MSSA	control	0.5	0.5
209P	DTBN併用	0.25	<0.06

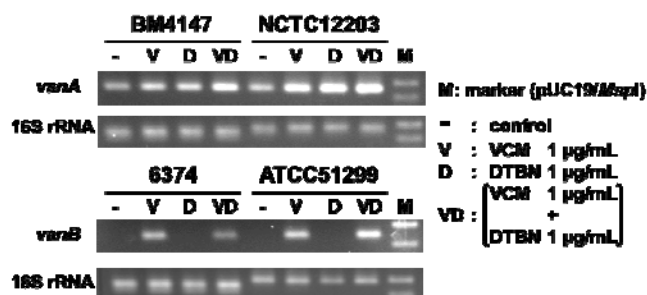


Fig. 3 バンコマイシン耐性遺伝子発現への影響  
VCM: vancomycin

### 【考察】

6,6'-dihydroxythiobinupharidine (DTBN) は MRSA や VRE といった薬剤耐性菌に対して、既存抗菌薬と同程度の強い抗菌活性を示した。更に、膜を肥厚させることでバンコマイシンに中程度耐性を獲得したバンコマイシン中程度耐性黄色ブドウ球菌 (VISA) に対しても DTBN は強い抗菌活性を示した。また、VRE に対して抗菌活性を示したことから、バンコマイシン耐性遺伝子を有するグラム陽性菌に対しても抗菌活性を示す可能性が考えられる。米国において、バンコマイシン耐性遺伝子を獲得することによってバンコマイシンに高度な耐性を獲得したバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) が報告され、その拡大が懸念されている。

DTBN は MRSA や VRE だけでなく、これらの VISA や VRSA といった更なる薬剤耐性菌に対する抗菌薬としても有効なシード化合物となる可能性が考えられる。

DTBN の抗菌作用機構について解析した結果、既存抗菌薬の作用機構のうち、タンパク質合成阻害活性や膜傷害活性を示さなかった。一方で DNA 複製に関与する酵素である Topoisomerase IV に対して強い阻害活性を示した (Fig. 2)。Topoisomerase IV は DNA 複製の際に生じる連環状 DNA の解消に関与している酵素であり、既存のキノロン系抗菌薬やノボビオシンの標的として知られている。キノロン系抗菌薬は Topoisomerase IV と DNA と三者複合体 (Cleaved complex) を形成することで抗菌活性を示す。また、ノボビオシンは DNA gyrase や Topoisomerase IV に対して ATPase 活性を阻害することで抗菌活性を示す。しかし、DTBN は Cleaved complex を形成せず、ATPase 活性も阻害しなかった。このことから、DTBN の Topoisomerase IV に対する作用機序は既存の Topoisomerase IV 阻害薬と異なることが示唆された。また、DTBN の曝露により、DNA gyrase や Topoisomerase IV の QRDR に変異が生じることでキノロン系抗菌薬に対して耐性を獲得した株が得られた (Table 1)。一方で、得られた変異株や QRDR に変異を有する臨床分離株に対して DTBN は強い抗菌活性を示した。このことから、DTBN は Topoisomerase IV を標的とする一方で、Topoisomerase IV に対する作用機序が既存の Topoisomerase IV 阻害薬とは異なる可能性が示唆された。DTBN は既存の Topoisomerase IV 阻害薬と異なる作用機序により交差耐性を示さず、新規抗菌薬のシード化合物として有用である可能性が考えられる。また、DTBN と既存抗菌薬の併用効果について解析した結果、DTBN は VRE に対してバンコマイシンやアミノグリコシド系抗菌薬と、MRSA に対してアミノグリコシド系抗菌薬と強い併用効果を示した (Table 2)。アミノグリコシド系抗菌薬は細胞壁合成阻害剤や細胞膜傷害性の抗菌物質と併用効果を示すことが報告されている。一方で、VRE に対してバンコマイシンの MIC を VSE と同程度まで回復させる活性を有する化合物は報告されていない。この作用機構を明らかにすることで、VRE 感染症に対する新たな治療薬の標的を確立できる可能性が考えられる。そこで、DTBN とバンコマイシンの併用効果について特に着目して解析を進めた。VRE に対して併用効果を示す一方で、感受性株に対して併用効果を示さないことから、DTBN はバンコマイシン耐性を抑制している可能性が考えられる。そこで、DTBN のバンコマイシン耐性遺伝子の発現に与える影響を評価した (Fig. 3)。しかし、DTBN はバンコマイシン耐性遺伝子の発現を低下させなかった。このことから、DTBN とバンコマイシンの併用効果は耐性遺伝子の発現低下によるものではないことが明らかとなった。そのため、DTBN はバンコマイシン耐性遺伝子が産生する酵素の活性を阻害している可能性が考えられる。

### 【結論】

臨床現場において問題となっている MRSA、VRE をはじめとするグラム陽性菌に対して、既存抗菌薬と遜色ない強い抗菌活性を有する化合物として DTBN を単離・同定した。DTBN はグラム陽性菌の Topoisomerase IV を阻害することにより抗菌活性を示すことが強く示唆された。一方で、DTBN は既存の Topoisomerase IV 阻害薬とは作用機序が異なる可能性が強く示唆された。また、DTBN は MRSA に対してアミノグリコシド系抗菌薬と、VRE に対してバンコマイシンやアミノグリコシド系抗菌薬と強い併用効果を示した。更に DTBN の耐性変異株の分離頻度はきわめて低いことも明らかとなった。これらの結果から、DTBN は MRSA や VRE といった薬剤耐性菌感染症に対する新たな治療薬のシード化合物として有用であると考えられる。

### 【参考文献】

Action mechanism of 6, 6'-dihydroxythiobinupharidine from *Nuphar japonicum*, which showed anti-MRSA and anti-VRE activities.

Shinya Okamura, Eri Nishiyama, Tomohiro Yamazaki, Nao Otsuka, Shoko Taniguchi, Wakano Ogawa, Tsutomu Hatano, Tomofusa Tsuchiya, Teruo Kuroda

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. Vol. 1850, Issue 6, 1245- 1252, 2015, IF 5.083